（様式３）

新潟大学脳研究所
「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

認知症疾患関連遺伝子の iPS 細胞を用いた生物学的機能探索

研究代表者：森　啓[1)]

研究分担者：桑野 良三[2)]，宮下哲典[2)]

[1)]大阪市立大学大学院医学研究科脳神経科学

[2)]新潟大学脳研究所・附属生命科学リソース研究センター・遺伝子機能解析学分野

研究要旨

認知症の関連遺伝子(*APP*、*PSEN1*、*PSEN2*、*PGRN*、*TAU*、*TDP43*)が解明されてきたが、これらの疾患関連遺伝子の生物学的機能探索が大きく遅れていることが主たる原因で分子機構の解明には至っていない。本研究は、関連遺伝子の新規探索を基礎に、これまで新潟大学脳研究所と大阪市立大学医学部との共同研究によって得られたオリゴマー変異(大阪変異)の生物学的意義をさらに掘り下げることにした。本研究では、京都大学 iPS 細胞研究所の井上治久博士のご協力を仰ぎつつ、*APP* の E693delta 変異(大阪変異)をもつ iPS 細胞を活用したエクソンレベルの遺伝子発現解析を行った。

A.研究目的

アルツハイマー病は、孤発性と家族性の大きく２つの発症型に分類される病態がある。とくに、家族性疾患は、症例数が少ないにも拘わらず、その生物学的なインパクトは決定的であり、孤発性全体を理解する上で欠かせない情報を提供してきた。今回、新潟大学と大阪市立大学によって発見された *APP* のオリゴマー変異である E693delta 変異（大阪変異）を有することによる遺伝子発現の変化を、エクソンレベルの発現解析によって検討した。

B.研究方法（倫理面への配慮を含む）

(1) iPS 細胞

井上治久先生（京都大学 iPS 細胞研究所）よりご恵与頂いた。実験に使用した iPS 細胞は、大阪変異を持つ患者（Case）とその対照（Control）に由来する。

（２）全 RNA の品質管理

iPS 細胞からニューロンに分化させた状態で全 RNA を抽出し、2100 バイオアナライザー（Agilent 社）を用いて品質管理（RIN［RNA integrity number］の算出：1ー10 の値を示し、数値が高いほど高品質［分解の程度が低い］）を行った。

（３）エクソンアレイ解析

GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array（Affymetrix 社）を使用し、取扱説明書に従って、反応実験を行った。エクソンアレイの正規化や統計解析には、Partek® Genomics Suite™ソフトウェアを使用した。Case（大阪変異：N=3）と Control（N=3）の遺伝子発現量を比較し、$P_{FDR} < 0.01$ を示し、且つ倍数変化 $> |2.0|$ の遺伝子を選抜した。

C.研究結果

抽出した全 RNA の品質管理を行ったところ、6 サンプルの RIN の平均値は 9.83、標準偏差は 0.14、範囲は 9.6ー10 であり、高品質であった（図 1）。エクソンアレイ解析を行ったところ、Case-Control 間で遺伝子発現量に有意差を認め

た遺伝子は 666 であった。Control 群に比べ Case 群で遺伝子発現量が上昇、減少していた遺伝子数はそれぞれ 436、230 であった。それらのうち Top10 を表に示す。

図. 全 RNA の品質管理

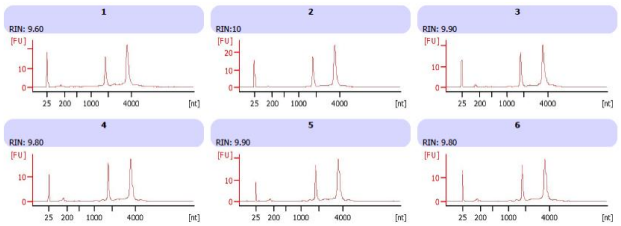

表:発現変動遺伝子

	発現上昇:Top10		発現減少:Top10	
	遺伝子	倍数変化	遺伝子	倍数変化
1	*DMD*	4.18	*ITGB4*	-7.83
2	*CPAMD8*	6.00	*CELSR1*	-3.30
3	*ITGBL1*	15.47	*TNC*	-2.61
4	*COL16A1*	3.89	*SEMA5B*	-4.87
5	*DPP6*	6.05	*MIR4640*	-2.27
6	*FN1*	2.26	*GPR98*	-3.83
7	*SLC6A13*	35.19	*SDK1*	-2.83
8	*TENC1*	5.21	*IQGAP2*	-2.19
9	*XPNPEP2*	10.34	*WWC1*	-3.92
10	*PRG4*	26.72	*CRB1*	-6.72

D. 考察

現在、アルツハイマー病発症機構として、Aβオリゴマーによる発症機構が中心的となってきているが、その生物学的機能については未知の部分が多い。今回、iPS 細胞化したアルツハイマー病患者由来のニューロンで遺伝子発現を検討することで、Aβオリゴマーがニューロンに及ぼす影響を遺伝子発現変動を通じて検討することが可能となった。本研究プロジェクトで得られた結果の正当性は、今後種々の観点から検証していく必要がある。

E. 結論

APP の E693delta 変異を有するアルツハイマー病患者とその対照から iPS 細胞を樹立し、そのエクソンアレイ解析を行った。両群間で遺伝子発現量が明らかに異なる 666 遺伝子を見出だした。今後それらの発現変動遺伝子と APP の E693delta 変異との関連を詳細に検証する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H (2012) ***Life Sciences.*** 01: 1169-1176. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of Aβ oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice.

Takano M, Maekura K, Otani M, Sano K, Nakamura-Hirota T, Tokuyama S, Min KS, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S. (2012) ***Neurochem Int.*** 61: 347-355. Proteomic analysis of the brain tissues from a transgenic mouse model of amyloid β oligomers.

Honjo Y , Ito H, Horibe T, Shimada H, Nakanishi A, Mori H, Takahashi R, Kawakami K. ***Neuroreport.*** (2012) Jul 11;23(10):611-5. Derlin-1-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer's disease.

Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H. (2013) ***Am J pathol*** (in press) Neurodegenerative Disorder FTDP-17 Related Tau Intron 10 +16C/T Mutation Increases Tau Exon 10 Splicing and Causes Tauopathy in Transgenic Mice.

2. 学会発表（学会名・発表年月・開催地なども記入）

Umeda T, Yamashita T, Tomiyama T, Takuma H, Ohnishi K, Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. The 17th Takeda Science Foundation Symposium on

Bioscience,Osaka Center for Learning and Innovation,Takeda Pharmaceutical Company Limited.2012.12.6-7.

梅田知宙、山下雄也、富山貴美、詫間浩、大西紀陽久、森啓. Intron 変異を有する新規 FTDP-17 モデルマウスの作製と解析. 第 31 回日本認知症学会（茨城県つくば市）2012.10.26-28.

野村幸子、梅田知宙、富山貴美、森啓. APP Osaka（E693Δ）変異はAβによる細胞内コレステロールの輸送・排出を阻害する. 第 31 回日本認知症学会学術集会（茨城県つくば市）2012.10.26-28.

Takami Tomiyama, Tomohiro Umeda, Takenari Yamashita, Kiyouhisa Ohnishi, Hiroshi Takuma, Hiroshi Mori. FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. The 11th International Conference On Alzheimer’s Diseases AD/PD2013, Florence,Italy, 2013.3.6-10.

G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

発明者：森啓・富山貴美・松本洋一・江口広志・九里祐一
発明の名称：認知症治療剤
出願番号：特願 2012-0124336
出願日：2012 年 5 月 31 日 2.実用新案登録

発明者：森啓・森田隆・吉田佳世
発明の名称：アルツハイマー病モデルマウス
出願番号：特願 2013-0126838
出願日：2013 年 2 月 14 日

3.その他

特になし